

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020030080735 A
(43)Date of publication of application: 17.10.2003

(21)Application number: 1020020019519
(22)Date of filing: 10.04.2002
(30)Priority: ..

(71)Applicant: EYEGENE INC.
(72)Inventor: LEE, GYEOM JEONG
AHN, BO YEONG
CHO, YANG JE
LEE, SEONG HO
YOO, WON IL

(51)Int. Cl. A61K 38/17

(54) COMPOSITION FOR TREATING OCULAR DISEASE, CONTAINING HUMAN INTEGRIN BINDING PROTEIN OR PEPTIDE AS EFFECTIVE COMPONENT

(57) Abstract:

PURPOSE: A therapeutic agent composition for treatment of ocular disease, containing saxatilin or human integrin binding protein having a similar sequence to the same as an effective ingredient and carriers is provided. The composition is effective in treatment of ocular disease such as diabetic retinopathy, age-related macular degeneration, retinopathy of prematurity, disease associated with angiogenesis such as angiogenesis-induced glaucoma, angiogenesis-induced corneal disease, etc. CONSTITUTION: The pharmaceutical composition for treatment of ocular disease associated with angiogenesis contains: saxatilin or human integrin binding protein having a similar sequence to the same; and furthermore carriers for suitable transmitting the drug. The carriers contain polyethylene glycol, dextran and a surfactant as a main component. The effective amount of the composition is in the range of 1microgram to 10mg per kg body weight in the case of vascular injection, 1ng to 1mg per eyeball in the case of ocular injection, and 1ng to 1mg per 1ml eye drop in the case of an eye drop.

copyright KIPO 2004

Legal Status

Date of request for an examination (20061011)
Notification date of refusal decision (00000000)
Final disposal of an application (rejection)
Date of final disposal of an application (20071119)
Patent registration number ()
Date of registration (00000000)
Number of opposition against the grant of a patent ()
Date of opposition against the grant of a patent (00000000)
Number of trial against decision to refuse ()
Date of requesting trial against decision to refuse ()

(19)대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51). Int. Cl.⁷
A61K 38/17

(11) 공개번호
(43) 공개일자
특2003-0080735
2003년10월17일

(21) 출원번호
(22) 출원일자
10-2002-0019519
2002년04월10일

(71) 출원인
아이진 주식회사
서울특별시 종로구 인사동 131 파고다빌딩 205호

(72) 발명자
이경정
대전광역시서구도마2동경남아파트113동309호

안보영
서울특별시서대문구북가좌2동80-145

조양재
서울특별시용산구도원동삼성래미안아파트106동204호

이성호
경기도고양시덕양구화정동옥빛마을1403동1103호

유원일
경기도성남시분당구수내동36양지마을청구아파트212-1005

(74) 대리인
이후동

심사청구 : 없음

(54) 인간 인테그린 결합 단백질 또는 펩타이드를 유효성분으로하는 안질환 치료용 조성물

요약

본 발명은 제조함된 디스인테그린게일 단백질 삭사트린(saxatitin) 및 이와 유사한 서열을 가진 인간 인테그린 결합 단백질을 유효성분으로 함유하고 안구내 망막조직으로 용이하게 약물을 전달할 수 있는 약학적 제제와의 혼합을 통해 완성된 안질환 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에서 서술한 바와 같이 삭사트린을 유효성분으로 함유하고 또한 약학적 제제를 포함하는 안질환 치료제로 개발하면, 종래의 외과적 수술에 의존했던 치료법을 대신하여 비용이 적게 들면서 손쉽게 치료할 수 있는 장점을 지닌 안질환 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 3a

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 삭사트린이 bFGF에 의해 유도된 가토의 각막 신생혈관 생성을 저해시키는 수술현미경사진이다.

도 2a는 일차배양된 망막세포에 삭사트린의 기초 독성을 확인하기 위해 농도별로(0, 12.5, 25, 100ug/ml) 처리한 후 관찰한 형광현미경 사진들이다.

도 2b는 일차배양된 망막세포에 삭사트린의 기초 독성을 확인하기 위해 농도별로(0, 12.5, 25, 50, 100ug/ml) 처리한 후 배지에 방출된 lactate dehydrogenase 효소를 조사한 그래프이다.

도 3a는 고암산소처리(75%) 후 정상 산소분압으로 낮추어 망막 신생혈관을 유발시키는 동물모델에서 삭사트린의 신생혈관을 저해시킨 관찰 사진들이다.

도 3b는 고암산소처리(75%) 후 정상 산소분압으로 낮추어 망막 신생혈관을 유발시키는 동물모델에서 삭사트린에 의해 용량-의존적으로 정상혈관 생성을 향상시키는 관찰 사진들이다.

도 4는 혈관신생에 관한 연구시스템인 HUVEC 세포(일차배양세포) 증식검사 시스템을 이용하여 벵크정제 삭사트린, 살모신, 제조합 삭사트린을 0.1mg/ml의 농도로 세포에 처리한 후 혈관세포의 생장이 얼마나 저해되는지를 보여주는 그래프이다.

도 5는 혈관신생에 관한 연구시스템으로 개발되어온 HUVEC 세포(일차배양세포) 증식검사 시스템을 이용하여 하이드로콜에 로딩된 삭사트린(농도 1mg/ml)이 방출되어 혈관세포의 성장을 저해하는지를 보여주는 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 제조화된 디스인테그린류 폴리펩타이드를 유효성분으로 함유하고 안구내 망막조직으로 용이하게 약물을 전달할 수 있는 약학적 제제와의 조합을 통해 완성된 안질환 치료용 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 Arg-Gly-Asp (RGD) 서열을 포함하고 있는 디스인테그린 계열 단백질로 VEGF(vascular endothelial growth factor) 및 bFGF(basic fibroblast growth factor)인자에 의해 유도된 혈관내피세포의 세포막에 존재하게 되는 각각의 인테그린 $\alpha v \beta 5$ 및 $\alpha v \beta 3$ 를 블로킹하여 혈관 신생을 강력하게 저해함으로써 비정상적인 혈관 신생을 강력하게 저해하여 질환 치료제로 사용하는 것에 관한 것이다.

신생혈관생성(Angiogenesis)은 기존의 미세혈관으로부터 sprout이 생성되고, 이 sprout이 증식하여 새로운 모세혈관이 생성되는 과정을 의미한다. 이 과정은 인체에서 태아의 성장, 자궁의 성숙, 태반의 증식, 황체형성 그리고 상처 치유시 매우 중요한 정상적인 과정이다(Gunther G. et al., *Oncology* 54:177-184(1997)). 고 혈압은 대표적으로 많은 신생혈관 생성을 동반하는 질환이지만 신생혈관이 암의 병인과 관계가 없으며 단지 급속하게 자라는 암조직의 영양분과 산소 공급을 위해서 발생되는 2차적인 특징이다. 암에서는 신생혈관을 억제하므로써 치료의 어느 정도의 효과를 볼 수 있으나 근원적인 치료는 불가능하다. 이에 반해, 신생혈관생성이 비정상적으로 증가하거나 정상적인 조절이 되지 못하여 발생하는 신생혈관 자체가 병인이 되는 질환들이 있다. 그 대표적인 병으로는 신생혈관 관련 안질환과 류마티스성 관절염, 건선, 화농성 육아종 등이다. 이런 질환들은 신생혈관을 억제시킴으로써 근원적인 치료가 가능하다.

안구에서는 신생혈관기능이 억제(turn-off)되어야 하나 이것이 잘못된 신호(Signal)로 인해 신생혈관기능이 활성화(turn-on)되면 심각한 안질환을 일으키며 이는 후천성 실명의 주요원인이 된다(Lois E. H. et al., *Nat Med.* 5:1390-1395(1999)). 대표적 신생혈관 관련 안질환에는 망막에 혈관이 형성되는 당뇨병망막병증(Diabetic retinopathy), 미숙아 망막증(Retinopathy of prematurity), 맥락막에 혈관이 형성되는 연령관련 황반변성(Age-related macular degeneration)이 있다(Almal A. E. et al., *Retina* 11:244-249(1991);Constantin J. P. et al., *Ophthalmology* 97:1329-1333(1990); Jin-Hong C. et al., *Current opinion in Ophthalmology* 12:242-249(2001);Peter A. C., *J of Cellular Physiology* 184:301-310(2000)). 현재 이런 안질환에 대한 치료법은 레이저 치료, 광응고술, 냉동응고술, 그리고 광역학치료(Visudyne)가 있다(Edwin E. B. et al., *Ophthalmology* 88:101-107(1981)). 이러한 치료법은 모두 수술에 의한 치료로, 약물에 의한 치료 법은 아직 개발단계에 머무르고 있다. 수술에 의한 치료는 모든 환자들에게 적용하여 수술할 수 없다는 큰 제약이 있을 뿐만 아니라 성공률도 낮으며 또한 그 비용이 매우 커서 사회적, 경제적 부담이 커서 수술을 할 수 없는 대부분의 환자는 현재 특별한 치료약이 없는 상태에서 많은 환자들 실명에 이른다. 인간의 수명이 연장되면서 이런 질환들은 계속적으로 증가하고 있으며, 적절한 치료제 개발은 시급한 실정이다. 따라서 현재 신생혈관 억제제에 대한 연구와 치료제 개발이 활발히 이루어지고 있고, 개발 중인 안질환 치료제는 스테로이드류, M

MP 억제제, 맥관형성성(angiogenic) 성장 인자에 대한 항체들이 대부분이다(Jeremy G. *et al.*, *Am J Pathology* 160:1097-1103(2002)). 본 발명에서는 기존의 개발 중인 치료제와 다른 작용기전으로 작용하여 신생혈관 생성억제 효능을 나타내는 디스인테그린(Disintegrin)을 이용하여 망막 및 맥락막의 신생혈관형성을 억제하는 새로운 안질환 치료제를 개발하였다.

신생혈관생성은 평광근과 내피세포에서 혈관세포 유착물질에 의하여 이루어진다. 세포유착은 기질 단백질과 인테그린(integrin) 패밀리를 포함한 특정 세포표면 수용체와의 결합이 요구된다(Brian P. Bliceiri, *Circ Res.* 89:1104-1110(2001)). 신생혈관 형성은 혈관세포 인테그린인 $\alpha v \beta 3$ 와 $\alpha v \beta 5$ 에 의한 2가지 경로가 존재하는 것으로 보고되고 있다(Lin L. *et al.*, *Exp. Eye Res.* 70:537-546(2000)). 이 두 인테그린은 맥관형성성(angiogenic) 혈관세포에서 발현되며, bFGF 및 VEGF에 의하여 유도되는 혈관형성에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Guoquan Gao *et al.*, *FEBS Lett.* 489:270-276(2001); Joan W. Millers *et al.*, *Ophthalmology* 100:9-14(1993); Napoleone Ferrara, *Curr Opin Biotech.* 11:617-624(2000); Martin Friedlander *et al.*, *Proc. natl. Acad. Sci.* 93:9764-9769(1996)). 일반적으로 디스인테그린은 bFGF에 의해 발현되는 $\alpha v \beta 3$ 인테그린의 강력한 길항제(antagonist)로 알려져 있으며, 본 발명에서 사용된 디스인테그린은 벡락으로부터 유래한 폴리펩타이드류이다(Sung-Yu H. *et al.*, *Thrombosis Res.*, 105:79-86(2002)). 대부분의 디스인테그린은 피브리노겐의 구조 모티프인 Arg-Gly-Asp(RGD) 또는 Lys-Gly-Asp(KGD) 서열을 포함하고 있다. 보고된 연구에 의하면, RGD 서열을 포함하는 디스인테그린은 세포가 ECM에 유착되는 것을 방지함으로써 새로운 혈관이 생성되는 것을 저해하는 것으로 알려져 있다(Victor I. R. and Michael S. G. *Prostate* 39:108-118(1999); Yohei M. *et al.*, *J of Biological chemistry* 276:31959-31968(2001)).

눈에서는 VEGF에 의해 발현되는 신생혈관 형성경로가 더 중요하다고 보고되고 있는 바, 본 발명자들은 최초로 실제 RGD 서열을 포함하는 디스인테그린이 bFGF가 아닌 VEGF가 주로 관여하는 안구내 신생혈관도 억제할 수 있는지에 대한 명확한 연구 결과를 얻었다.

또한 눈이라는 특수한 구조면에서 고려해 볼 때, 폴리펩타이드류인 삭사트린은 단독으로는 안구 외부에 투여하여 질환부위까지 도달할 수 없으며, 직접 주사에 의한 약물투여 경로 또한 반복적 투여가 불가능하므로, 안구내에 투여되어 효과적인 약효를 발휘할 수 있는 폴리펩타이드류를 운반하고 서서히 지속적으로 방출할 수 있는 안구 전용 약학적 제제가 요구되어 왔다.

이에 디스인테그린인 삭사트린을 이용하여 신생혈관에 의한 안질환 치료제를 개발하고자 연구한 결과, 삭사트린이 VEGF가 주 원인이 되는 안구내 신생혈관생성을 억제함으로써 안질환 치료에 효과적임을 확인하였고, 삭사트린을 안구내로 침투가 잘되게 하는 점안액 형태의 제제 및 텍스트란, 알부민, 또는 생체분해성분의 폴리머젤 및 나노분자등과 혼합된 상태로 만들어 약리 현상을 관찰한 결과, 부작용이 없으면서, 효과적이고 장시간 지속적인 약리 효과를 나타내었다. 따라서 삭사트린은 안구내 신생혈관을 강력하게 저해함으로써, 안구내 질환인 당뇨병성망막증, 미숙아 망막증, 연령관련 황반변성등 안구내 신생혈관의 치료에 효과적임을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기한 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 신생혈관 억제를 이용한 치료제와 약물을 전달할 수 있는 적절한 운반체를 고안하여 안과질환치료제를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 삭사트린 또는 이와 유사한 서열을 가진 인간 인테그린 결합 단백질을 유성분으로 하는 신생혈관관련 안질환 치료를 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명에서 적용될 수 있는 안질환은 당뇨병망막증, 노인성황반변성증, 미숙아망막증, 신생혈관성 녹내장, 신생혈관성 각막질환, 신생혈관성 홍채질환 등이다.

또 본 발명의 조성물은 폴리에틸렌글리콜, 텍스트란 및 계면활성제를 주성분으로 하는 약물침투를 위한 점안용 운반제 및 하이드로겔인 주사용 약물방출용 운반제 또는 나노 및 마이크로 입자형인 주사용 약물방출용 운반체를 더욱 포함한다.

또한 본 발명의 조성물의 유효량은 혈관주사인 경우 범위는 무게당 Kg당 1 μ g ~ 10mg이고, 안구주사인 경우 범위는 사람 안구당 1ng ~ 1mg이며, 점안제인 경우 범위는 점안액 1ml당 1ng ~ 10mg인 것을 특징으로 한다.

상기의 유효량 범위보다 낮은 범위에서는 약효가 약하거나 거의 나타나지 않으며, 초과범위에서는 그 이하에서 나타나는 약리효능에 비해 큰 차이를 보이지 않는 상태에서 용량만 증가하게 되어 상기와 같은 범위가 가장 바람직하다.

이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

순수분리 정제된 재조합 삭사트린을 생체내 조건에서 안구내 신생혈관 생성에 미치는 영향을 분석하여 다음과 같은 신규한 현상을 발견하였고, 안구에 적용하기 위한 적절한 약학적 제제의 조성을 안구내 약물 투여시 새로운 장점이 발견되었다. 첫째, 삭사트린은 안구내에서 저산소에 의해 발현되는 α v β 5 인테그린을 블로킹함으로써 강력하게 신생혈관 억제형성 작용을 한다. 둘째, 산소분압 동물모델을 통해 발생단계에서 삭사트린이 진화 정상적으로 발현되는 혈관생성은 억제하고 오히려 정상혈관형성을 돕는다. 셋째, 생분해성이며 수용성인 폴리머겔(biodegradable hydrogel)은 안구내에서 투과성하며, 효과적으로 삭사트린을 운반하고 안정화시키며 고분자합성 조건에 따라 다양한 약물 방출속도 조건(몇일에서 1년)이 가능하다. 넷째, 생분해성 고분자로 만든 나노입자형태의 약학제제는 입자가 작아 빛의 굴절 및 회절을 일으키지 않으므로써 안구내에서 빛이 통과경로에 있는 특수한 장소에도 투여가 가능하다는 장점을 갖는다. 따라서 본 발명의 이용은 안구혈관 중 비정상적인 신생혈관이 유도된 질환 즉, 당뇨병망막증, 노인성 황반변성증, 미숙아망막증 등에 바람직하다.

이하, 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.

실시예 1: 무혈관조적인 안구각막조직에서 bFGF에 의해 유도된 삭사트린의 신생혈관 억제 효과

삭사트린은 bFGF에 의해 혈관내피세포에서 유도되는 인테그린인 α v β 3이 세포외기질(ECM)과 부착되는 것을 블로킹함으로써 혈관생성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 하지만 삭사트린에 의한 안구에서 혈관내피세포의 성장 저해 및 혈관형성 저해에 관한 연구는 보고 된 바 없었다. 삭사트린의 안구내 신생혈관의 생성에 영향을 미치는지 여부를 조사하기 위하여 가토 눈의 각막에 마이크로프로젝트를 만들어 bFGF가 250ng이 함유된 펠렛을 삽입하여 신생혈관을 유도시키는 모델을 만들었다. 이때 삭사트린의 효능을 보기 위해서 펠렛에 삭사트린 1mg을 포함시켰다. 그로부터 5일 후에 가토의 눈을 해부한뒤경으로 신생혈관 생성 여부를 관찰하였다. 그 결과, 삭사트린이 bFGF로 유도된 안구 혈관내피세포의 성장을 효과적으로 저해되는 것이 확인되었다. (참조: 도 1)

상기와 같은 삭사트린에 의한 안구의 무혈관조직에 bFGF로 유도된 신생혈관생성 저해는 안구내 혈관조직에서도 다른 조직의 혈관과 마찬가지로 bFGF가 α v β 3 인테그린을 유도시키고 삭사트린이 이를 블로킹했음으로 설명할 수 있다. 한편, 실험에 사용된 가토에서 삭사트린에 의한 각막온락과 같은 부작용은 전혀 관찰되지 않았다.

실시예 2: 일차배양된 망막세포에서 삭사트린의 기조독성검사

안구는 중추신경계의 일부이다. 특히 망막조직에는 시신경(optic nerve)과 각종 중간신경원(interneuron), 신경절(regal ganglion cell), 및 빛감각세포(photoreceptor)들이 대부분이다. 이들 세포는 매우 민감하여 작은 자극에도 세포사멸이 일어날 수 있으며, 이들은 한번 사멸하면 다시 재생되지 않는다. 따라서 삭사트린이 이들 신경세포에 독성을 나타내는데 대한 조사는 매우 중요한 사항이다. 이를 검증하기 위해 2일령되는 ICR마우스의 안구로부터 망막의 일차배양을 시행하여 삭사트린 농도별로(0, 12.5, 25, 50, 100 ug/ml) 처리하여 LDH assay와 Hoechst-PI 염색법으로 세포독성을 조사하였다. (참조: 도 2a, 2b)

그 결과 대조군에 비교해서 농도에 따른 삭사트린의 망막세포의 독성은 거의 없음을 확인하였다. 따라서 삭사트린을 안질환 치료제를 위해서 사용할 경우 최소한 신경계에는 독성의 문제가 없다.

실시예 3: 산소 분압 변화를 이용한 망막내 신생혈관 생성유도 마우스모델에서 삭사트린의 신생혈관생성 저해

산소 분압차에 의한 인위적인 망막 내 신생혈관 생성은 인간의 미숙아 망막증과 당뇨병망막증과 같은 양상을 보인다. 출생초기에 고산소환경(75%)에 노출시킨 마우스를 다시 정상 산소분압(20%)으로 복귀시키면 비정상적인 신생혈관을 자발적으로 생성하는 원리를 이용하여 실험하였다. 이를 위해서 산소분압을 조절할 수 있는 장치에서 태어난지 7일 후에 75% 산소 분압을 유지하는 고압산소 환경에서 5일 간 방치한 후 정상 산소분압인 20% 산소압에서 5일간 다시 방치한다. 이때 5일간 하부에 한변씩 삭사트린을 마우스 Kg당 0.001, 0.01, 0.1, 1 mg 씩 복강내로 투여하여 삭사트린의 망막내 신생혈관 억제 현상을 관찰하였다. 혈관을 관찰하기 위해서 생리식염수 1ml에 2X10⁶ 분자량의 FITC-렉스트란을 50mg 녹인 용액을 좌심실을 통해 주입하였다. 주입 후에는 바로 마우스의 안구를 적출하였다. 적출한 안구는 생리식염수로 세척 후 4% paraformaldehyde로 4시간에서 24시간 동안 고정한 후, 안구로부터 렌즈를 제거하고 망막을 유리 슬라이더 위에 평평하게 핀 후 글리세린-필리핀으로 방압하여 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. (참조: 도 3a)

그 결과 고압산소 처리 후 생리식염수만 처리한 마우스의 망막의 주변부에 심하게 신생혈관이 형성되어 있는 것을 발

견하였으나, 0.01mg/Kg 이상 식사트린을 처리한 군에서는 효과적으로 신생혈관이 지체되었다. 신생혈관 억제 양상은 용량-의존적으로 나타났다. 이러한 결과는 이 산소분압 동물모델에서 VEGF가 유도되고 신생혈관을 망막에서 유발시키는 기존의 결과로부터 식사트린이 VEGF에 의해 발현되는 인테그린 $\alpha v \beta 5$ 의 길항제로서 작용하고 있음을 확인하였다.

한편, 고압산소에 방치된 어린 마우스는 제대로 성장한 마우스에 비해 망막의 혈관 조직이 제대로 발생되지 않았다. 그런데 식사트린을 처리한 군에서는 용량-의존적으로 정상 발생되는 혈관이 제대로 형성되는 것이 관찰되었다(참조: 도 3b). 이것은 식사트린이 정상혈관에 아무런 영향을 미치지 않는다는 가정 이상으로 정상혈관의 성장을 도와주는 역할을 한다는 점에서 매우 흥미롭다. 신생혈관 억제 효능 외에 이런 정상혈관의 형성을 향상시켜주는 효능은 처음으로 밝혀진 내용이었다. 이것은 식사트린같은 용해성 폴리펩타이드가 인테그린에 부착되어 세포성장과 관련된 신호전달을 전달하는 것과 연관되어 있는 것으로 추론되며, 이런 식사트린 효능은 미숙아에서 일어나는 망막증에 있어서는 신생혈관 재혈종 외에 정상혈관 발달을 도와주는 역할을 함으로서 큰 장점이 있을 것이다.

실시예 4 : 신생혈관 생성 저해에 있어 다른 디스인테그린인 살모신과 식사트린의 비교

식사트린과 유사한 서열을 가지는 다른 단백질이 식사트린과 비슷한 기능을 수행하는지를 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 하였다. 식사트린과 마찬가지로 백색에 주출하여 정제한 살모신은 식사트린과 유사한 서열을 지닌다. 이에 백색에 정제한 살모신과 식사트린 및 제조한 식사트린이 혈관 형성에 미치는 영향을 조사하였다. 혈관신생에 관한 연구시스템으로 개발되어온 HUVEC 세포(일차배양세포) 증식검사 시스템을 이용하여 살모신, 식사트린 그리고 제조한 식사트린이 얼마나 혈관세포의 성장을 저해하는지 관찰하였다. 살모신, 식사트린, 제조한 식사트린을 HUVEC 세포에 각 0.1mg/ml의 농도로 처리한 후, 48시간동안 배양하였다. 배양한 세포를 트립신으로 단계분화시키고 세포수를 측정하였다. 그 결과 3개의 디스인테그린인 살모신, 식사트린, 제조한 식사트린 모두 비슷한 비율로 혈관의 성장을 억제하였다.(참조:도표 4) 따라서 이 결과는 식사트린 뿐만 아니라 이와 유사한 서열을 지닌 단백질이 혈관신생을 억제한다는 것을 보여준다.

실시예 5 : 안질환 치료용 약물방출용 운반체를 통한 식사트린의 신생혈관 생성 저해

식사트린은 폴리펩타이드류로서 비교적 큰 분자량을 가지므로 안질환에 사용하려면 안구조직 특성에 맞는 운반체가 반드시 필요하다. 단순히 점안액을 통해 망막같은 안구내 깊숙이 존재하는 목표 위치에 도달시키기에 어려움이 있다. 그리고 시스템릭한 주사방식은 많은 비용과 부작용을 야기시킬 가능성이 크다. 따라서 안구내 직접 주사하는 방식의 운반체의 필요성이 요구되었다. 또한 이구는 반복적인 주사 투여는 감염의 위험성에 노출될 수 있으므로 한 번 투여로 오래동안 방출되는 특징을 갖는 운반체가 필요하였다. 그리고 상에서 언급했듯이 신경독성 때문에 운반체는 반드시 신경독성이 없어야 한다. 이런 조건을 만족시킬 수 있는 운반체는 수용성 생분해성 폴리머젤이 가장 적합하였다. 폴리머젤은 반응조건에 따라 각각 다른 그라프트율을 가진 겔을 형성할 수 있으며 이에 따라 다른 방출속도를 가지므로 큰 장점이 된다. 식사트린을 생분해성 폴리머젤인 하이드로겔에 로딩시켜 실험실적 조건에서 혈관형성에 미치는 영향을 분석하였다. 혈관신생에 관한 연구시스템으로 개발되어온 HUVEC 세포(일차배양세포) 증식검사 시스템을 이용하여 하이드로겔에 로딩된 식사트린이 방출되어 혈관세포의 성장을 저해하는지 관찰하였다. 48시간 안에 모두 방출될 수 있는 조건의 하이드로겔에 1ml에 1mg의 식사트린을 혼합하여 세포배양액 400 μ l(24웰 조직배양용기)에 40 μ l을 넣었다. 그리고 이어서 세포에 1mg/ml의 농도로 용해된 bFGF로 처리하고, 72시간 동안 더 배양한 다음, 세포를 트립신으로 단계분화시키고 세포수를 측정하였다. 그 결과 대조군은 bFGF에 의하여 세포증식이 2배이상 증가하였는데, 식사트린이 혼합된 하이드로겔에서는 증식이 거의 제되었다(참조: 도 5). 따라서 이 결과는 하이드로겔에서 식사트린의 제어할 수 있는 방출이 잘 일어난다고 있음을 보여 주고 있는 것이다. 겔의 합성조건에 따라 다른 방출속도를 갖는 겔을 만드므로서 용도에 맞추어 식사트린 방출을 제어하여 사용할 수 있다. 또한 겔 형태도 나노입자 형태로 구성하는 것이 가능하므로 빛의 산란과 투과방해등의 문제도 해결함으로써 안구 전용 운반체로의 장점을 갖을 수 있다.

발명의 효과

본 발명은 기존 외과적 수술에만 의존했던 신생혈관 관련 안과질환 치료방법 외에 치료약물을 통한 새로운 치료법을 제시하고 있다. 외과적 수술에는 많은 비용 소요와 모든 환자에게 적용할 수 없는 한계를 지녔으나, 본 발명은 신생혈관 관련 안과질환치료에 획기적인 방법이며, 실명의 예방이 가능하다. 식사트린의 안구내 신생혈관 억제 특징은 기존에 존재하는 정상혈관과 세포이 형성되는 발생단계의 정상적인 신생혈관의 형성에 전혀 영향을 미치지 않는다. 오히려 발생단계에서 정상혈관의 생성을 도움으로써 미숙아 망막증 같은 발생단계에 있는 환자에서 매우 큰 장점을 보인다. 만약 모든 신생혈관을 억제한다면 미숙아 망막증에는 적용될 수 없다. 따라서 식사트린의 미숙아 망막증 치료제로서의 가치는 매우 높다. 또한 당뇨망막증이나 노인성황반변성증인 경우 만성적인 복증을 보여며 장기간 치료로 요한다. 따라서 본 발명용의 약제제제에 의한 약물거동시간의 자유로운 조절은 치료에 있어 의사와 환자의 요구에 부응되고 용이성이 최대로 활용될 것으로 보이며 무엇보다 치료시 감염등 위험성을 최소화했다. 또한 본 발명에 의한

제형은 안과용 치료에 가장 적합하며 오랜 시간 작용하므로 효율성면에서도 뛰어나다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

삭사트린 또는 이와 유사한 서열을 가진 인간 인테그린 결합 단백질용 유효성분으로 하는 신생혈관관련 안질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 2.

제 1 항에 있어서,

상기의 안질환은 당뇨병망막증, 노인성황반변성증, 미세아망막증, 신생혈관성 녹내장, 신생혈관성 각막질환, 신생혈관성 홍채질환인 것을 특징으로 하는 안질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 3.

제 1 항에 있어서,

상기의 조성물은 폴리에틸렌그리콜, 덱스트란 및 계면활성제를 주성분으로 하는 약물검투를 위한 점안용 운반체를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 안질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 4.

제 1 항에 있어서,

상기의 조성물은 하이드로겔인 주사용 약물방출용 운반체 또는 나노 및 마이크로 입자형인 주사용 약물방출용 운반체를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 안질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 5.

제 1 항 내지 제 4 항 중 임의의 한 항에 있어서,

상기의 조성물의 유효량은 혈관주사인 경우 범위는 몸무게 Kg당 1 μ g ~ 10mg인 것을 특징으로 하는 안질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 6.

제 1 항 내지 제 4 항 중 임의의 한 항에 있어서,

상기의 조성물의 유효량은 안구주사인 경우 범위는 사람 안구당 1ng ~ 1mg인 것을 특징으로 하는 안질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 7.

제 1 항 내지 제 4 항 중 임의의 한 항에 있어서,

상기의 조성물의 유효량은 점안액인 경우 범위는 점안액 1ml당 1ng ~ 10mg인 것을 특징으로 하는 안질환 치료용 약학적 조성물.

도면

도면1



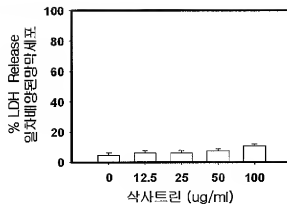
대조군 bFGF유도 신생혈관

삭사트린 처리군

도면2a



도면2b



도면3a

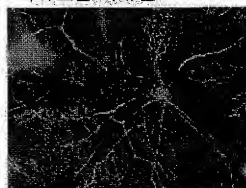
정상 (18일경 마우스 망막)



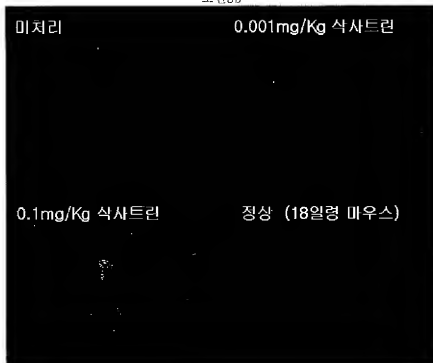
75% 고압산소 후 20% 정상산소분압 처리군



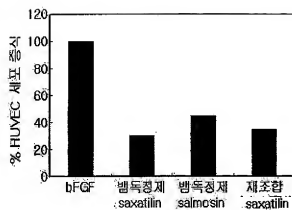
식사트랜 처리군



도면3b



도면4



도면5

